

THESIS

MUNICH

1967

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN MENSCHLICHEN CHROMOSOMEN
DER GRUPPE G BEI MONGOLISMUS
UND CHRONISCHER MYELOISCHER LEUKÄMIE

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

Peter Baumann

AUS DEM HÄMATOLOGISCHEN INSTITUT DER GSF
ASSOZIATION EURATOM, MÜNCHEN

Leiter: Prof. Dr. W. Stich

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN MENSCHLICHEN CHROMOSOMEN
DER GRUPPE G BEI MONGOLISMUS
UND CHRONISCHER MYELOISCHER LEUKÄMIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Peter Baumann
aus München

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. STICH
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. SCHWIEGK
Dekan:	Prof. Dr. F. HOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 12. 1967

IN DANKBARKEIT
MEINEN LIEBEN ELTERN
GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

A EINLEITUNG

- 1) Differenzierung der Chromosomenpaare 21 und 22 auf Grund morphologischer Eigenschaften
- 2) Differenzierung der Chromosomenpaare 21 und 22 auf Grund funktioneller Eigenschaften mittels Autoradiographie
- 3) Problemstellung und
Hinweis auf die Beziehung der Chromosomen der Gruppe G zur Leukopoese beziehungsweise Leukämogenese

B MATERIAL UND METHODIK

- 1) Kasuistik des Patientenguts
- 2) Herstellung der Blutkulturen
- 3) Herstellung der Autoradiogramme
- 4) Methodik der Auswertung der erhobenen Befunde
 - a) Allgemeines über Fehlermöglichkeiten in der Autoradiographie
 - b) Daraus gezogene Rückschlüsse für die vorliegende Arbeit

C ERGEBNISSE

- 1) bei Mongolismus
 - a) Synthesemuster der G - Chromosomen
 - b) Statistische Auswertung
- 2) bei chronischer myeloischer Leukämie
 - a) Dauer der G₂-Zeit
 - b) Synthesemuster der G - Chromosomen und des Philadelphia Chromosoms
 - c) Statistische Auswertung

D DISKUSSION DER ERGEBNISSE

- 1) Kriterien der Auswahl des Untersuchungsmaterials
- 2) Abgrenzung der G-Autosomen zum y-Chromosom
- 3) Diskussion des semiquantitativen Verfahrens
- 4) Diskussion der Befunde und deren statistischer Auswertung bei Mongolismus und chronischer Myelose
- 5) Mögliche Ursachen für das Versagen der Methode
- 6) Diskussion der Befunde am Ph¹-Chromosom

E ZUSAMMENFASSUNG

F TABELLEN

G LITERATURANGABEN

A. EINLEITUNG

1) DIFFERENZIERUNG DER CHROMOSOMENPAARE 21 UND 22 AUF GRUND MORPHOLOGISCHER EIGENSCHAFTEN

Älteste und allgemein anerkannte Kriterien für die Differenzierung des Chromosomenmaterials einer Zelle sind die Größenunterschiede und die Lage des Zentromers der einzelnen Chromosomen. Wenn man nun die Chromosomen auf Grund dieser Prinzipien anordnet, so erhält man sieben (A-G) morphologisch eindeutig zu unterscheidende Gruppen. Eine weitere Aufgliederung der einzelnen Gruppen ist nur mehr bezüglich der Größenunterschiede möglich, die jedoch nicht mehr signifikant sind. So gelingt meist nur bei den drei Gliedern der Gruppe A eine sichere Identifizierung. Die Homologenpaare der Gruppe G, denen die vorliegende Untersuchung gilt, sind nur bei einigen Personen zu identifizieren. Dabei sind entweder die langen oder die kurzen Arme oder beide Arme des Chromosomenpaares 21 größer als die des Paares 22 (4, 11, 1). Bei den meisten Probanden kann aber eine solche Unterscheidung nicht gemacht werden. Diese Schwierigkeit versuchte man in der Denver-Nomenklatur dadurch zu umgehen, daß man der Definition der kleinen akrozentrischen Chromosomen das Vorhandensein- oder Nichtvorhandensein von Satelliten zugrundelegte. Dies erwies sich jedoch als wenig vorteilhaft, da man bald erkannte, daß alle akrozentrischen Chromosomen potenzielle Satellitenträger sind (2).

Zusammenfassend muß man also feststellen, daß nur in den wenigsten Fällen eine Identifizierung der Homologenpaare 21 und 22 auf Grund morphologischer Kriterien mit ausreichender Sicherheit möglich ist.

2) DIFFERENZIERUNG DER CHROMOSOMENPAARE 21 UND 22 AUF GRUND AUTORADIOGRAPHISCHER UNTERSUCHUNGSMETHODEN

Untersuchungen über die Vorgänge bei der DNS-Reduplikation wurden durch die Anwendung tritiierten Thymidins in Verbindung mit autoradiographischen Methoden entscheidend gefördert. Durch die Arbeiten von Taylor und Mitarb. (1957) wurden die Grundlagen der DNS-Verdopplung erforscht und bedeutende Erkenntnisse über den Aufbau der Chromosomen gewonnen. Der erste Bericht über einen Unterschied in der Beendigung der Synthesezeit des genetischen Materials in den einzelnen Chromosomen erfolgte durch Lima de Faria (1959). Seitdem haben zahlreiche Forscher autoradiographische Untersuchungsmethoden angewandt. Dabei wurde zwar die Aufmerksamkeit vor allem auf das X-Chromosom gerichtet, aber gleichzeitig wurden an den Autosomen Befunde erhoben, die dafür sprachen, daß auch unter ihnen relativ große Unterschiede bezüglich des Zeitpunkts, zu dem die DNS-Reduplikation beendet wird, auftreten (3, 4, 5, 6, 7). Mittels schematisierter Aufstellungen zeigten verschiedene Autoren, daß auf Grund des Synthesemusters d. h. auf Grund von Unterschieden in der Einbaurate von Isotopenmaterial in die Chromosomen eine Identifizierung morphologisch nicht mehr differenzierbarer Homologenpaare möglich ist. Für die Autosomen der Gruppe G wurde festgestellt, daß ein Homologenpaar wahrscheinlich Nr. 22 die Synthese eher beendet als das andere.

3) PROBLEMSTELLUNG

Die Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, Aufschluß darüber zu erhalten, ob in den Fällen von chronischer myeloischer Leukämie ein Chromosom des die DNS-Synthese früh oder spät beendenden Homologenpaares fehlt, beziehungsweise bei Mongolismus überzählig ist.

Die vorliegende Arbeit wurde vor allem im Hinblick auf die in den letzten Jahren diskutierte Beziehung der G_1 -Chromosomen zur Granulopoese (16) begonnen. Folgende Befunde legten den Gedanken nahe, daß auf dem G_1 -Chromosom Gene mit entsprechender Merkmalsausprägung liegen:

- a) Bei Mongolismuspatienten beobachtet man ein gehäuftes Auftreten von akuter myeloischer Leukämie. Den exakten Nachweis dafür lieferten Ste-

wart und Mitarb. (1958), die aufzeigten, daß unter 677 kindlichen Todesfällen an akuter Leukose 17 (= 2,6 %) Mongoloide waren. Diese Patienten haben außer der Trisomie 21 keine andere Abweichung vom normalen Chromosomensatz. Die meisten Fälle von Leukämie bei Down's Syndrom sind von der akuten Form, aber auch die chronische Myelose kann mit Mongolismus vergesellschaftet sein (15). In diesem von Cawein berichteten Fall fand sich außer einem Ph^1 -Chromosom keine Trisomie. Es wurden auch Familien beschrieben, bei denen eine regelrechte Tendenz zu Mongolismus und akuter myeloischer Leukämie besteht (12). Engel und Mitarb. berichteten von sieben mongoloiden Kindern, bei denen im Zeitraum vom 2. bis 5. Lebensjahr eine später spontan remittierende akute Myelose auftrat (28).

- b) Mittwoch fand in Blutausstrichpräparaten von Mongolismuspatienten eine Verminderung der Kernläppchenzahl von polymorphkernigen Neutrophilen. Ebenso sind Drumsticks bei weiblichen Mongoloiden in geringerem Prozentsatz als im normalen Vergleichsgut.
- c) Die chronische myeloische Leukämie geht mit einer Deletion des langen Armes des Chromosoms Nr. 21 einher (9, 10, 34, 16).
- d) Gewöhnlich ist die alkalische Leukozytenphosphatase bei Mongoloiden erhöht und in Fällen von chronisch myeloischer Leukämie erniedrigt (23), so daß vermutet wurde, daß das Gen für das Enzym auf dem durch Deletion verlorengegangenen Stück des langen Arms von Chromosom Nr. 21 liegt. Teplitz beschrieb jedoch etliche Fälle von erhöhtem ALP-Index bei chronischer Myelose (24).
- e) Gavosto fand in Fällen von akuter myeloischer Leukämie eine erhöhte spezifische Einbaurate von Tritium-Thymidin in Chromosom Nr. 21.

Bereits 1960 vermutete Baikie (30) auf Grund der damals bekannt gewesenen Befunde, daß die bei Mongolismus und chronischer myeloischer Leukämie am Chromosomenmaterial beobachteten Regelwidrigkeiten ein und das gleiche Chromosom betreffen.

B. MATERIAL UND METHODIK

Das Untersuchungsmaterial wurde aus Blutkulturen von 11 Patienten gewonnen. Darunter befanden sich fünf mongoloide Kinder, drei Mädchen und zwei Knaben, und sechs Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, fünf Männer und eine Frau.

Sämtliche fünf mongoloiden Kinder waren im Alter von drei bis fünf Jahren und hatten eine Trisomie des Chromosoms 21.

Von den sechs Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie waren zum Zeitpunkt der cytogenetischen Untersuchung zwei Patienten unbehandelt, zwei weitere waren etwa ein bis zwei Jahre vorher einer Milzbestrahlung unterzogen worden und die restlichen drei Patienten standen unter einer intensiven cytotatischen Therapie. Kasuistik mit hämatologischem Status zum Zeitpunkt der cytogenetischen Untersuchung siehe Tabelle I.

Die Herstellung der Blutkulturen erfolgte nach dem von Moorehead und Mitarb. (8) angegebenen Verfahren, das lediglich etwas modifiziert wurde. Dabei wurden 10 ml Blut der Cubitalvene entnommen, mit 0,2 ml 0,1 % Heparin versetzt und bei Zimmertemperatur etwa eine Stunde aufbewahrt. Phytohämagglutinin - M (0,2 ml) wurde nur dem Blut der mongoloiden Kinder zugeführt, nicht dagegen dem leukämischen Blut. Von dem erhaltenen Leukozytensediment wurden zwei bis drei Tropfen in ein etwa 8 ml Medium 199 und 2 ml autologes Plasma enthaltendes Kölbchen gegeben, so daß die Zellkonzentration im Nährmedium ca. 300-500 / mm³ betrug. Phytohämagglutinin-M versetzte Kulturen wurden 72 Stunden bei 37 °C inkubiert, Leukämiekulturen nur 24 oder 48 Stunden bei 37 °C bebrütet, nachdem in Übereinstimmung mit Tough und Mitarb. (29) in diesem Labor festgestellt wurde, daß in diesem Zeitraum der Mitoseindex am günstigsten ist (32). 1 1/2 Stunden vor der Fixation der Kulturen wurde Colcemid (Ciba) bis zu einer Konzentration von 0,03 Mikrogramm/ml Medium zugefügt. Dann wurde das Zellmaterial nach vorsichtigem Zentrifugieren bei 300 bis 500 Umdrehungen/min vom überstehenden Medium befreit und für 20 min. mit 0,95 %iger Natriumcitratlösung (37 °C) überschichtet. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellmaterial mit frisch zubereitetem Methanol-Eisessig (Gemisch von 3 Volumenteilen Methanol / 1 Volumenteil Eisessig) fixiert, auf Äther-Alkohol gereinigte Objektträger aufgeblasen und an der Luft getrocknet.

Der Herstellung der Autoradiogramme wurde die Methode von W. Schmid zugrundegelegt (5). Tritium-Thymidin (spez. Aktivität 1,9 C/mM) wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 mikroCurie/ml Medium drei bis acht Stunden vor der Beendigung der Kultur beigegeben. Bei Mongolismus-Blutkulturen betrug diese Zeit konstant 5 1/2 Stunden. Da man für die G₂-Zeit (Zeitraum zwischen dem Ende der Synthesezeit und dem Beginn der Mitose) im Durchschnitt vier Stunden veranschlagt, hatten die Zellen das Isotop von einigen Minuten bis zu 1 1/2 Stunden, je nach der Position der einzelnen Zelle im Reifezyklus, zum Einbau zur Verfügung. Bei der chronischen Myelose mußte die Zugabezeit von Isotopenmaterial im Lauf der Versuche von anfangs drei Stunden auf 7 1/2 bis 8 Stunden verlängert werden. Wir gehen darauf im Absatz "Ergebnisse" näher ein:

Die Orcein gefärbten Präparate wurden mit Kodak Stripping Film AR - 10 belegt. Der auf Glasplatten aufgezugene Film wurde mittels eines vorgefertigten Rähmchens, das entsprechende Einteilungen enthielt, und eines Lineals in 45 x 30 mm große Stückchen geschnitten. Nachdem man die noch auf der Glasplatte haftenden Filmstückchen für etwa drei Minuten in absoluten Äthyl-Alkohol gelegt hatte, konnten sie mit einer Pincette vorsichtig abgelöst und in ein mit destilliertem Wasser gefülltes Gefäß gegeben werden. Dabei mußte man darauf achten, daß sich die Schichtseite immer unten befand. Nach weiteren sechs Minuten wurden die noch auf dem Wasser schwimmenden Filme auf die untergetauchten Objektträger gezogen. Nachdem man sich durch leichtes Betasten der Ränder davon überzeugt hatte, daß die Filme ohne Falten zu liegen kamen, wurden die Präparate zwei Stunden in einem Trockenschrank aufbewahrt. Anschließend wurden sie in Bakelit-Kästchen gegeben, die zu einem Fünftel des Inhalts blaues Kieselgel enthielten. Die Expositionszeit betrug zwischen 5 und 8 Tagen.

Die Entwicklung der Filme wurde mit der folgenden, jeweils frisch hergestellten Lösung durchgeführt:

Amidol	1,8 gr
Na-Pyrosulfit	7,2 gr
Kaliumbromid 10 %	
gelöst in Aqua dest.	5 ml
Aqua dest.	ad 400 ml

Die Entwicklungszeit betrug sechs Minuten bei einer Temperatur des Entwicklers von 18°C. Die Filme wurden dann in 33 %iger Natrium-Thiosulfat-Lösung 20 Minuten fixiert und in fließendem Wasser 30 bis 45 Minuten gewässert. Dabei mußte man darauf achten, daß sich die Filme nicht von der Unterlage lösten.

Zunächst wurden nur leicht bis stark gekörnte Mitosefiguren im Mikroskop auf-
 gesucht, im Zeiss-Photomikroskop bei einer Vergrößerung von 12,5 x 100
 und Immersionsöl auf Agfa-Agepe-Kleinbildfilmmaterial photographiert und
 die Lokalisation der Mitose mittels "English-Finder" notiert. Anschließend wur-
 de das Immersionsöl im Xylolbad entfernt. Die Ablösung des Stripping-Filmes
 erfolgte im 40 °C warmen Wasserbad nach 5 bis 10 Minuten ohne manuelle
 Hilfe. Die noch auf dem Präparat verbliebenen Körner wurden mittels einer
 7,5 %igen Kaliumferrizyanidlösung (5 min.) reduziert (21). Um die durch die
 Einwirkung des roten Blutlaugensalzes hervorgerufene Verfärbung der Präparate
 rückgängig zu machen, wurden die Objektträger für je zwei Minuten in zwei
 20 %ige Natrium-Thiosulfat-Bäder getaucht. Darauf wurden sie für 10 Minuten
 in fließendes Wasser gestellt. Die folgende Färbung wurde mit gepufferter
 Giemsalösung (10 min.) durchgeführt:

1) Puffer:	Methanol	30 ml
	Na-Hydrogenphosphat	Lösg. 30 ml
	Eisessig	2-5 Tropfen
	Aqua dest.	1 000 ml

2) Giemsa Stammlösung

dabei wurden 40 Vol. Teile Puffer auf 2 Vol. Teile Giemsakonzentrat gegeben
 und 10 Minuten gefärbt. Differenziert wurden die Präparate unter Sichtkontrol-
 le mit folgender Lösung:

absol. Äthanol	100 ml
Essigsäure 0,4 %	0,2 ml

Dann wurden die Präparate mit Deckgläsern versehen, die notierten jetzt nicht
 mehr gekörnten Mitosen aufgesucht und ein zweites Mal photographiert.

4) METHODIK DER AUSWERTUNG

a) Allgemeines zur Anwendung der Autoradiographie in der Cyto-genetik

Ziel einer quantitativen Autoradiographie in der Cyto-genetik ist, durch die Demonstration von Unterschieden in der Einbaurrate von Isotopenmaterial in die Chromosomen Aufschluß über die identische Reduplikation des genetischen Materials und den Aufbau der Chromosomen zu erhalten. Bei bekannter Halbwertszeit und spezifischer Aktivität der den Zellen angebotenen radioaktiven Verbindung müßte sich die eingebaute Stoffmenge aus der Silberkornzahl, wenn sie der Zahl der radioaktiven Zerfälle proportional ist, ermitteln lassen. Die Genauigkeit der Ergebnisse wird aber durch zahlreiche Fehlermöglichkeiten eingeschränkt:

- aa) Das Gesetz des radioaktiven Zerfalls verlangt eine Streuung der Zerfallsereignisse in Form einer Normalverteilung.
- bb) Besonders bei der Verwendung von Tritium markierten Substanzen ist die β -Selbstabsorption von Bedeutung. Die Reichweite dieses Fehlers ist jedoch vom Cyto-genetiker nicht abschätzbar, da über den Aufbau der Chromosomen nichts genaueres bekannt ist und regionäre Änderungen der Dichte beziehungsweise des Kontraktionszustandes nicht ausgeschlossen werden können. Zusätzliches Absorbermaterial zwischen Tritium enthaltenden Strukturen und Filmschicht, vor allem als Cytoplasmaschicht unterschiedlicher Dicke, schränken die Aussagekraft beträchtlich ein.
- cc) Unter Effektivität versteht man das Verhältnis von den während der Expositionszeit eingetretenen Zerfällen zu der Anzahl der entstandenen Silberkörner. Sie ist abhängig von der Geometrie zwischen Nuklid und Film, von der Energie der β -Teilchen, der Größe der β -Selbstabsorption und der Empfindlichkeit des Filmmaterials. Bei cyto-genetischen Untersuchungen ist die Effektivität im Vergleich zu Schnitt- oder Ausstrichpräparaten nicht günstig; sie liegt nach Hughes (33) bei 20 %, d.h. etwa 5 Zerfälle sind zur Bildung eines Silberkorps nötig.
- dd) Als weiterer Fehler bei der quantitativen Autoradiographie ist die Koinzidenz zu beachten. Darunter versteht man, daß mehr als ein β -Teilchen auf denselben Silberbromidkomplex trifft. Dies ist natürlich besonders bei einer nicht homogenen Verteilung des Isotops, wie bei cyto-genetischen Untersuchungen, der Fall.
- ee) Schließlich ist noch mit einem Fehler in der Beurteilung der Körnerzahl zu rechnen. Er wird mit ungefähr 10 % veranschlagt, steigt aber bei größeren Silberkorndichten sicherlich noch weiter an.

ff) Der Nulleffekt, durch geeignete Verfahren auf ein Minimum reduziert, spielt bei Untersuchungen mit cytogenetischen Fragestellungen, wenn er hinreichend klein ist, keine Rolle mehr.

Sämtliche unter a-c angeführten Fehler werden umso kleiner je mehr Zerfälle sich ereignen beziehungsweise je mehr Silberkörner gezählt werden. Deshalb ist es wichtig den Gesamtfehler dadurch verhältnismäßig zu verkleinern, daß die Expositionszeit genügend lange ist und das zur Auswertung gelangende Untersuchungsmaterial angemessen groß ist.

b) Folgerungen für die vorliegende Arbeit

Im Bestreben die Fehlerquote möglichst niedrig zu halten, wurden Expositionszeiten von fünf bis acht Tagen gewählt. Da andererseits die dadurch entstandenen hohen Silberkornzahlen eine starke Erhöhung des Meßfehlers bei der visuellen Zählung ergeben hätten, der natürlich durch die geringe Größe der Chromosomen der Gruppe G besonders stark ins Gewicht gefallen wäre, wurde durch vergleichende Schätzung der geschwärzten Flächen über den einzelnen Chromosomen der Markierungsgrad als

- schwer - mittel - leicht - leer -
- ● - ◐ - ☒ - ○ -

codifiziert. Dies geschah in der Vorstellung, daß sich die geschwärzten Flächen proportional zur Körnerzahl verhalten. Diese Schätzung wurde von zwei verschiedenen Personen durchgeführt. Zur Kontrolle wurde bei 54 Mitosefiguren bei Mongolismus durch eine weitere Person eine Körnerzählung über den Chromosomen 21 und 22 (bei einem Präparat, das kürzer exponiert wurde) durchgeführt.

Code	Körnerzahlen über 21 und 22 bei Mongolismus	Gesamt- Chromo- somenzahl	Verhältnis von im Be- reich zu nicht im Bereich liegend	%
●	15, 7, 11, 17, 11, 6, 7, 10, 12, 9, 7, 12, 9, 11, 7, 14, 11, 15, 10, 7, 10, 9, 6, 15, 9, 8, 9, 8, 14, 10, 10, 6, 15, 10	34	24/10	70,5
●	4, 5, 11, 11, 10, 6, 7, 12, 11, 5, 5, 9, 7, 10, 6, 8, 7, 5, 6, 5, 7, 7, 7, 6, 6, 3, 7, 7, 3, 5, 4, 5, 3, 6, 6, 8, 7, 8, 8, 5, 6, 6, 4, 8, 5, 5, 7, 5, 5, 8, 9, 6, 4, 7, 7, 6, 6, 5	58	44/14	76
⊗	5, 4, 6, 4, 4, 7, 2, 3, 3, 4, 7, 1, 3, 5, 1, 4, 2, 9, 5, 4, 3, 3, 3, 0	23	16/7	69,5
○	0, 0, 0, 1, 0	5	4/1	75
	Gesamt	120	88/32	73,5

Werden nun für schwer: 8 - 15
mittel: 5 - 8
leicht: 1 - 4
leer: null Körner als Grenzen angenommen,
so befinden sich rund 73,5 % der ausgezählten Chromosomen im jeweili-
gen Code-Bereich. Dieses Verfahren erweist sich also als durchaus tragbar
für die Untersuchung an den kleinsten Chromosomen des menschlichen Chro-
mosomensatzes. Dieses Verfahren wurde auch von anderen Autoren ange-
wandt (13, 14, 20).

1) ERGEBNISSE BEI MONGOLISMUS

Bei fünf Chromosomen in der Gruppe G und vier verschiedenen Schwärzungsgraden gibt es insgesamt 56 verschiedene Möglichkeiten der Kombination, wenn die Stellung nicht berücksichtigt wird. Davon wurden diejenigen 15 Möglichkeiten, bei denen sich die fünf Chromosomen bezüglich des Schwärzungsgrades wie drei stärker markierte zu zwei schwächer oder garnicht markierten verhielten, zur Gruppe A zusammengefaßt; entsprechend diejenigen 15 Möglichkeiten, bei denen das Verhältnis von stark gekörnt zu schwach gekörnt wie zwei zu drei war, zur Gruppe B. Aus den 26 restlichen Möglichkeiten, die keine drei zu zwei Aufteilung mehr boten, wurde die Gruppe C gebildet (Tabelle II).

Von den fünf Mongolismuspatienten wurden insgesamt 216 Mitosefiguren in der oben beschriebenen Weise ausgewertet. Dabei entfielen auf A-Kollektiv für alle die Befunde, bei denen drei Chromosomen eine späte und zwei eine frühe Beendigung der DNS-Reduplikation zeigen - 95 Mitosen.

60 Mitosefiguren zeigten über zwei Chromosomen eine späte und über drei Chromosomen eine frühe Beendigung der DNS-Synthese an; sie bilden die Gruppe B. Die restlichen 61 Mitosen waren weder A noch B eindeutig zuzuordnen.

Die Einzelergebnisse bei den jeweiligen Patienten zeigen in drei Fällen eine ziemlich gleichmäßige Streuung auf die drei Gruppen. Bei zwei Patienten steigt die Anzahl der in Gruppe A befindlichen Mitosen auf 50 % der Gesamtzahl der ausgewerteten Mitosen an (Tabelle III).

Statistische Untersuchungen

Von den insgesamt 216 untersuchten Zellen waren 95 eindeutig A, 60 eindeutig B zuzuordnen. 61 erlaubten keine saubere Klassifikation. Geht man daher von einem statistischen Gesamtumfang von $n = 95 + 60 = 155$ aus, so ergibt sich für die relativen Häufigkeiten:

$$p_A = \frac{95}{155} = 0,613; \quad \text{ sowie } p_B = \frac{60}{155} = 0,387;$$

Für P_A , den wahren Anteil der Fälle A, ergibt sich mit 99,74 % (d.h. $t = 3$;

folgender Vertrauensbereich (näherungsweise Ersatz der Binominalverteilung durch die Normalverteilung):

$$P_A - t \sqrt{\frac{P_A \cdot P_B}{n}} \leq P_A \leq P_A + t \sqrt{\frac{P_A \cdot P_B}{n}} ;$$

$$0,613 - 3 \sqrt{\frac{0,613 \cdot 0,387}{155}} \leq P_A \leq 0,613 + 3 \sqrt{\frac{0,613 \cdot 0,387}{155}}$$

$$0,496 \leq P_A \leq 0,703 ;$$

analog für P_B : $0,270 \leq P_B \leq 0,504 ;$

Geht man davon aus, daß $P_A = 1$ sein muß, so folgt aus diesem Vertrauensbereich, daß dem Testverfahren mit Mißtrauen zu begegnen ist. Das gleiche gilt für $P_B = 1$.

Wird dagegen angenommen, $0 < P_A ; P_B < 1$ sei möglich, dann liegen diese mit 99,74 % Wahrscheinlichkeit innerhalb der oben angegebenen Vertrauensbereiche.

2) ERGEBNISSE BEI DER CHRONISCHEN MYELOSE

Gänzlich unvermutet kam früher die Entdeckung, daß Zellen einer Lymphocytenkultur nach Beendigung der Synthesezeit nicht unmittelbar in Teilung übergehen. Diese Zeitspanne zwischen der S-Phase und der Metaphase wird G_2 -Zeit genannt. Ihre Dauer wird für menschliches Zellmaterial auf drei bis vier Stunden veranschlagt (5), jedoch ist ihre Variabilität wohl bekannt (3). Sie wird bestimmt, indem man die Leucocytenkultur zwei, drei oder vier Stunden nach Zugabe des Isotops fixiert und untersucht ob die Chromosomen markiert sind oder nicht. Zeigen die Chromosomen keine Körnung, so folgt daraus, daß sie zum Zeitpunkt der Zugabe des Isotops ihre Synthese bereits beendet hatten. Man verändert also den Zeitpunkt der Fixation solange, bis die ersten gekörnten Mitosen auftauchen.

In der Vorstellung, daß leukämische Zellen eine starke Proliferationstendenz

mit entsprechend kurzen Generationszeiten haben, wurden die Blutkulturen zunächst 4 1/2 Stunden mit Tritium-Thymidin (und 1 1/2 Stunden mit Colcemid) vor der Fixation inkubiert. Wir fanden keine einzige markierte Mitose. Schrittweise wurde dann die Inkubationszeit mit Tritium vergrößert. Erst bei sieben bis acht Stunden zeigte der größte Teil der Mitosen Körnung. Daraus zogen wir den Schluß, daß die G_2 -Zeit im Falle der chronischen myeloischen Leukämie fünf bis sechs Stunden dauert.

Bei der chronischen myeloischen Leukämie sind in der Gruppe G des menschlichen Chromosomensatzes nur mehr drei normale Autosomen. Da jedes davon vier Markierungsgrade annehmen kann, gibt es insgesamt 20 Möglichkeiten der Kombination, wenn man die Stellung nicht berücksichtigt. Davon wurden diejenigen sechs Möglichkeiten, bei denen sich die drei Chromosomen hinsichtlich der Körnung wie ein stärker markiertes zu zwei schwächer oder gar nicht markierten verhielten, zur Gruppe A zusammengefaßt. War dagegen das Verhältnis von stark gekörnten zu schwach oder gar nicht gekörnten wie zwei zu eins, so wurden die jeweiligen Kombinationen der Gruppe B zugeordnet (Tabelle IV).

Von den sechs Patienten mit chronischer Myelose wurden insgesamt 261 Mitosen in der oben beschriebenen Weise ausgewertet. Davon entfielen auf die Gruppe A -Kollektiv für alle die Befunde, bei denen ein Chromosom eine späte und zwei Chromosomen eine frühe Beendigung der DNS-Synthese zeigten- 106 Mitosen; das sind rund 41 %. Bei 64 Mitosen war das Verhältnis umgekehrt; sie bilden die Gruppe B. 91 Mitosen zeigten ein Synthesemuster, das weder A noch B zuzuordnen war.

Die Ergebnisse der einzelnen Patienten zeigen in drei Fällen eine fast gleichmäßige Verteilung auf die Gruppen A, B und C. Bei den anderen drei Patienten liegen 35 bis 47 % der Mitosefiguren in der Gruppe A (Tabelle V).

Das Ph^1 -Chromosom zeigt eine ziemlich gleichmäßige Verteilung ohne jede Tendenz einer Häufung bei A, B oder C. Es wurden Befunde erhoben, die sehr für eine völlige Regellosigkeit der DNS-Synthese sprechen: so war das Ph^1 -Chromosom zweimal stark und zweimal mittel markiert, während die G-Autosomen völlig frei waren; umgekehrt war es einmal unmarkiert als die anderen stark gekörnt waren (Tabelle VI). Lediglich bei den einzelnen Patienten scheint eine Tendenz zur Bevorzugung eines spät oder früh die DNS-Synthese beendenden Ph^1 -Chromosoms zu bestehen.

Statistische Untersuchungen

Von den insgesamt 261 untersuchten Zellen waren 106 eindeutig A, 64 eindeutig B zuzuordnen; 91 erlaubten keine saubere Klassifikation. Ausgehend von einem statistischen Gesamtumfang von $n = 106 + 64 = 170$, ergibt sich für die relativen Häufigkeiten:

$$p_A = \frac{106}{170} = 0,624; \quad \text{ sowie } p_B = \frac{64}{170} = 0,376;$$

Für P_A , den wahren Anteil der Fälle A ergibt sich mit 99,74 %iger Wahrscheinlichkeit (d.h. $t = 3$) folgender Vertrauensbereich (Approximation der Binominalverteilung durch die Normalverteilung):

$$p_A - t \sqrt{\frac{p_A \cdot p_B}{n}} \leq P_A \leq p_A + t \sqrt{\frac{p_A \cdot p_B}{n}};$$

$$0,624 - 3 \sqrt{\frac{0,624 \cdot 0,376}{170}} \leq P_A \leq 0,624 + 3 \sqrt{\frac{0,624 \cdot 0,376}{170}}$$

$$0,513 \leq P_A \leq 0,735;$$

analog für P_B : $0,265 \leq P_B \leq 0,487;$

Geht man davon aus, daß $P_A = 1$; oder $P_B = 1$; sein muß, so folgt aus diesen Vertrauensbereichen, daß dem Testverfahren mit Mißtrauen zu begegnen ist.

Wird dagegen angenommen $0 < P_A$; $P_B < 1$ sei möglich, dann liegen diese mit 99,74 % Wahrscheinlichkeit innerhalb der oben angegebenen Vertrauensbereiche.

D. DISKUSSION

In der cytogenetischen Literatur findet sich immer wieder die Erwähnung, daß der Mitoseindex der Leukozyten bei der chronischen Myelose unter Kulturbedingungen oft sehr niedrig ist. So mußten wir 25 Blutkulturen ansetzen, um sechs zu erhalten, bei denen die Menge und die Qualität der Mitosen den zeitlichen Aufwand der Auswertung gerechtfertigt erschienen ließen. Die mit Phytohämagglutinin behandelten Blutkulturen von Mongoloiden machten diesbezüglich keine Schwierigkeiten. In die Auswertung einbezogen wurden nur solche Mitosefiguren, bei denen im Autoradiogramm der Nulleffekt sehr gering war und die nach Entfernung des Films

- a) Vollständigkeit zeigten und
- b) die G-Chromosomen eindeutig erkennen ließen.

Ausgeschieden wurden ferner Mitosen, wenn die G-Chromosomen eine zu enge Lagebeziehung zu anderen Chromosomen hatten, so daß Zweifel hätten entstehen können, von welchem Chromosom die Körnung stammt. Insgesamt wurde aus einem Material von 1700 photographierten Mitosen die Auswahl getroffen.

Arbeitserleichternd war die Tatsache, daß das ebenfalls zur G-Gruppe gehörende y-Chromosom keine Schwierigkeiten hinsichtlich der Abgrenzung von den Autosomen bereitete. In den Autoradiogrammen zeigte es regelmäßig die stärkste Markierung von allen G-Chromosomen. Morphologisch konnte es auf Grund seiner charakteristischen Form -die beiden Chromatiden sind auf der ganzen Länge eng aneinandergelegt (38)- ebenfalls gut erkannt werden.

Zur Auswertung wurde ein semiquantitatives Verfahren gewählt, da es, wie schon im Absatz über Methodik dargelegt, größere Sicherheit zu gewährleisten schien. Dazu weist Schmid (5) auf die Insuffizienz der Silberkornzählung bei kleinen Chromosomenpartikeln hin, wenn keine großen Unterschiede zwischen den verglichenen Einheiten bestehen. Und nach German (3) ist zum Zweck der Demonstration von unterschiedlichen Markierungsgraden der einzelnen Chromosomen langexponierten, wegen zu starker Silberkornentwicklung nicht mehr auszählbaren Autoradiogrammen der Vorzug zu geben. Mit Recht kann jedoch unserem Verfahren entgegengehalten werden, daß durch die rein subjektive Beurteilung der "geschwärzten Flächen" ein umso größerer Meßfehler wirksam wird. Darauf ist zu erwidern, daß auch bei Silberkornzählungen ein recht ansehnlicher Fehler in Betracht gezogen werden muß. Außerdem versuchten wir den Fehler dadurch zu verkleinern, daß die Einschätzung der Markierung von zwei Personen vorgenommen wurde. Traten krasse Unterschiede in der Beur-

teilung auf, so wurden die betreffenden Mitosebilder aus der Wertung ausgeschieden. Andere Autoren arbeiteten mit einem ähnlichen Verfahren (13, 14, 20).

Bei der Auswertung zeigte sich dann ein gehäuftes Auftreten von Mitosen in der Gruppe A, d. h. bei denen zwei G-Chromosomen die DNS-Synthese früh und drei im Falle des Mongolismus bzw. eines im Falle der chronischen Myelose die Synthese spät beenden. Mit 45 % von 216 Mitosen bei Mongolismus und 41 % von 261 bei der chronischen Myelose in Gruppe A lagen die Ergebnisse bemerkenswert dicht beieinander. Wir befinden uns damit in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren. Yunis (13, 14) fand bei Mongolismus 65 von 103 Mitosen für Gruppe A, das sind rund 60 %. Es ließe sich zeigen, daß es sich bei der Abweichung seiner Werte von den unseren nur um statistische Schwankungen handelt. Schmid beschreibt auch ein Überwiegen von drei stark markierten gegenüber zwei-schwächer markierten G-Chromosomen, macht jedoch leider keinerlei Zahlenangaben (5). Mehrere Autoren ziehen aus diesen und ähnlichen Ergebnissen den Schluß, daß mit diesem Verfahren eindeutig die Homologen der Gruppe G identifiziert werden können; andere Autoren verhalten sich abwartend (39) beziehungsweise betonen die nicht gleichzeitige Beendigung der DNS-Synthese der Homologen (35, 36, 37). Aber auch die Befürworter der Möglichkeit einer Trennung von Chromosom 21 und 22 mittels Autoradiographie müssen auf eine gewisse asynchrone Synthese der Homologen hinweisen (3, 5).

Es dürfen jedoch offensichtliche Erfolge dieser Methode nicht in Frage gestellt werden:

- 1) Die Identifizierung des allozyklischen X bzw. Y-Chromosoms gelingt in fast jeder Zelle. Bei Intersexen kann so mit Sicherheit die Konstellation der Geschlechtschromosomen ermittelt werden.
- 2) Das Auftreten von morphologisch besonders gekennzeichneten Extrachromosomen (z. B. Isochromosomen) bei G/G, D/D, G/D Translokationen konnte geklärt werden.
- 3) Man fand eine direkte Beziehung zwischen dem Auftreten von Änderungen des Spiralisationsgrades der Chromosomen sog. "secondary constrictions" und immer gleichen Chromosomensegmenten, die die DNS-Synthese spät beenden.

Andere Ergebnisse, vor allem solche, bei deren Mitteilung kein Zahlenmaterial zur Verfügung gestellt wurde, können durchaus den wahren Sachverhalt darstellen, jedoch bleiben Zweifel, ob man diesen, für den Autor evidenten Befunden glauben kann.

Ziel solcher Untersuchungen ist, ein repräsentatives Schema der DNS-Synthesezeitbeendigung zu erhalten. In Übereinstimmung mit Patau, sind wir der Meinung, daß dies in erster Linie ein statistisches Problem ist. Es wurde deshalb versucht, der statistischen Untersuchung ein möglichst großes Material zuführen zu können. Dabei sollte untersucht werden, in wie weit aus dem empirischen Befund die Hypothese bestätigt werden kann, daß die Homologen die die DNS-Synthese gleichzeitig beenden d.h. entweder P_A oder P_B , also einer der sogenannten wahren Anteilswerte in einer unendlich groß gedachten Grundgesamtheit, gleich 1 ist. Man erhält unter Zugrundelegung einer Aussagesicherheit von 99,7 % die Vertrauensbereiche:

$$\begin{array}{rcccl} 0,496 & \leq & P_A & \leq & 0,730 \\ 0,270 & \leq & P_B & \leq & 0,504 \end{array} \quad \text{bei den untersuchten}$$

Mongolismuspatienten und

$$\begin{array}{rcccl} 0,513 & \leq & P_A & \leq & 0,735 \\ 0,265 & \leq & P_B & \leq & 0,487 \end{array} \quad \text{bei den Probanden}$$

mit chronischer myeloischer Leukämie, d.h., daß die wahren Werte P_A ; P_B fast sicher in den angegebenen Bereichen liegen müssen. Es wird dabei unterstellt, daß die Trennung in die beiden Fälle A und B durch den Test eindeutig durchgeführt werden kann.

Die gefundenen Vertrauensbereiche legen folgende Interpretation nahe:

- 1) Geht man davon aus, daß sicher P_A oder $P_B = 1$ richtig ist, dann muß gefolgert werden, daß der durchgeführte Versuch keine eindeutige Kategorisierung zu liefern in der Lage ist.
- 2) Die Hypothese, daß P_A oder P_B außerhalb der oben angegebenen Bereiche liegen, insbesondere, daß P_A oder $P_B = 1$ gilt, wird durch das Versuchsergebnis nicht bestätigt. Damit wird die Theorie, daß die Homologen der Gruppe G auf Grund der unterschiedlichen Synthesezeitbeendigung zu identifizieren seien, in Frage gestellt.

Die durchgeführte statistische Untersuchung zeigt somit deutlich auf, daß sich der auf Grund des zahlenmäßigen Überhangs der Gruppe A anbietende Schluß, bei beiden Anomalien des menschlichen Chromosomensatzes weise das gleiche Homologenpaar die charakteristischen Veränderungen -bei Mongolismus im Sinne einer Trisomie, bei der chronischen myeloischen Leukämie im Sinne einer Monosomie- auf, nicht gerechtfertigt ist. Die eingangs gestellte Aufgabe konnte also nicht gelöst werden. An möglichen Ursachen für das Versagen der angewandten Methode kommen in Betracht:

- 1) Das im Falle des Mongolismus überzählige bzw. bei der chronischen Myelose

fehlende Chromosom stammt wechselweise von Zelle zu Zelle verschieden sowohl vom Homologenpaar 21, als auch vom Paar 22. Genetisch ist dies jedoch nicht vorstellbar.

- 2) Die Homologenpaare beenden nicht gleichzeitig ihre DNS-Synthese. Nach German (3) ist dieses Phänomen in der Gruppe der G-Chromosomen besonders häufig zu beobachten.
- 3) Der Unterschied in der Einbaurate an Isotopenmaterial ist zu gering. Schmid (5) und Moorehead (6) betonen gegenüber Morishima (7), daß keines der beiden Paare 21 oder 22 eine besonders späte Beendigung der Synthese hat. Außerdem ist bei Anomalien des genetischen Materials eine Änderung des Synthesemusters zu diskutieren. Gavosto (26) weist in diesem Zusammenhang darauf hin, daß bei akuten myeloischen Leukämien beide Paare die Synthese sehr spät und fast gleichzeitig beenden.

Durch die Arbeiten von Rudkin (19) ist bekannt, daß das Ph^1 -Chromosom etwa $2/3$ der Masse von normalen G-Chromosomen hat. Allgemein wird angenommen, daß es durch Deletion eines normalen G-Chromosoms entstanden ist. Sein Markierungsmuster müßte also davon bestimmt sein, ob es von dem angeblich die Synthese früh oder spät beendenden Homologenpaar abstammt und ob wiederum früh oder spät beendende Anteile des Chromosoms verloren gegangen sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Beziehung des Ph^1 -Chromosoms zu A oder B erkannt werden. Auch konnte die Meinung von Schmid, es beende seine Synthese auffallend spät, nicht bestätigt werden. Wir befinden uns damit in Übereinstimmung mit Haynes (20). Die erhobenen Befunde lassen unwillkürlich an eine völlige Regellosigkeit der DNS-Synthese denken. Es fiel lediglich eine gewisse Häufung von früh oder spät synthetisierenden Ph^1 -Chromosomen bei den einzelnen Patienten auf. Eine Beziehung zur Prognose bzw. zur Schwere des Krankheitsbildes konnte nicht festgestellt werden.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Mittels autoradiographischer Methoden sollte untersucht werden, ob in den Fällen von chronischer myeloischer Leukämie ein Chromosom des die DNS-Synthese früh oder spät beendenden Homologenpaares fehlt, bzw. bei Mongolismus überzählig ist. Obwohl die Befunde in beiden Fällen zahlenmäßig auf das spät beendende Paar hinwiesen, konnte die statistische Untersuchung des erhaltenen Zahlenmaterials die Vermutung nicht bestätigen, daß die Trisomie bei Mongolismus und die Monosomie bei der chronischen Myelose am gleichen Homologenpaar statthat. Ein besonderes Synthesemuster des Ph¹-Chromosoms konnte nicht erkannt werden.

KASUSTIK:

Patient	: Nikolaus F.	Kurt S.	Vinze
Alter (geboren am)	: 21. 9. 22	30. 6. 20	23. 7.
Krankheit bekannt seit	: 1962	Oktober 1965	April
Verlauf (Behandlung)	: mehrmals stationär dauernd ambulant	erstmal stationär	zweir.
Aufnahmebefund			
Größe/Gewicht	: 172 cm / 70 kg	175 cm / 69,8 kg	---
Leber (Größe / Konsistenz)	: 5 QF, weich	4 QF, weich	---
Milz (Größe / Konsistenz)	: reicht ins kl. Becken	bis ins kleine Becken	4 cm
Blutbild:			
Hb (gr%)	: 11,6 gr%	73 %	16,9
Erythrocyten (/mm ³)	: 3,87	3,76	5,34
Hb _E	30 gamma	FI = 0,47	31,7
Leucocyten (/mm ³)	: 76 000	236 000	54 000
davon in % : segmentkernige	34	42	13
stabkernige	21	20	9
jugendliche	12	8	14
Myelocyten	10	13	5
Promyelocyten	18	11	11
Myeloblasten	1	4	42
eosinophile	3	--	2
basophile	-	--	-
Lymphocyten	1	2	4
Thrombocyten (/mm ³)	: 300 000	675 000	77 000
ALP-Index	: 72	---	0-20
Knochenmarksbefund	: 1962 Myelotomie: gesteigerte Prolifera- tion normaler Zellen mit Fibro- sierungstendenz.	kein Befund vorhanden	kein F vorha
Verlauf	: Beginn 1962 als Polycythämia vera (Aderlaß, Thio-tepa) Mai 1963 Anämie Oktober 1963 leu- kämioide Reaktion.	Myleran 2 x 2 mg Beginn mit gastri- schen Beschwerden Druck im Ober- bauch	Beginn körperl. Zentr. throm Myler
Sonstiges		LDH 458,0	

A		B		C	
● ● ● ● ●	16	● ● ● ● ●	7	● ● ● ● ●	-
● ● ● ● ☒	6	● ● ● ● ☒	4	● ● ● ● ☒	-
● ● ● ● ○	6	● ● ● ● ○	4	● ● ● ● ○	-
● ● ● ☒ ☒	3	● ● ☒ ☒ ☒	-	● ● ● ☒ ○	3
● ● ● ☒ ○	4	● ● ☒ ☒ ○	3	● ● ● ☒ ☒	1
● ● ● ○ ○	5	● ● ○ ○ ○	2	● ● ● ○ ○	5
● ● ● ☒ ☒	4	● ● ☒ ☒ ☒	3	● ● ☒ ○ ○	3
● ● ● ☒ ○	7	● ● ☒ ☒ ○	1	● ● ● ● ●	9
● ● ● ○ ○	11	● ● ○ ○ ○	1	● ● ● ● ☒	5
● ☒ ☒ ○ ○	-	● ☒ ○ ○ ○	3	● ● ● ● ○	1
● ● ● ☒ ☒	11	● ● ☒ ☒ ☒	4	● ● ● ☒ ○ ○	4
● ● ● ☒ ○	2	● ● ☒ ☒ ○	4	● ☒ ☒ ☒ ☒	-
● ● ● ○ ○	14	● ● ○ ○ ○	14	● ☒ ☒ ☒ ○	1
● ☒ ☒ ○ ○	4	● ☒ ○ ○ ○	6	● ○ ○ ○ ○	2
☒ ☒ ☒ ○ ○	2	☒ ☒ ○ ○ ○	4	● ● ● ● ☒	2
				● ● ● ● ○	1
15	95	15	60	● ● ☒ ○ ○	10
				● ● ☒ ☒ ☒	-
				● ● ☒ ☒ ☒ ○	3
				● ○ ○ ○ ○	5
				☒ ☒ ☒ ☒ ○	2
				☒ ○ ○ ○ ○	-
				● ● ● ● ●	1
				● ● ● ● ●	3
				☒ ☒ ☒ ☒ ☒	-
				○ ○ ○ ○ ○	-
15	95	15	60	26	61
	==		==		==

TABELLE II

Darstellung der Aufteilung des Gesamtmaterials von 216 Mitosefiguren auf sämtliche denkbaren Möglichkeiten des Synthesemusters der Chromosomen der Gruppe G bei Mongolismus.

Patienten / Geschlecht		A	B	C	Gesamtzahl der ausgewerteten Mitosen:
Sch. A.	weibl.	8	6	7	21
E. P.	männl.	8	7	7	22
Br. G.	weibl.	12	11	9	32
M. R.	weibl.	30	16	14	60
G. K.	männl.	37	20	24	81
		95	60	61	216

TABELLE III

Übersicht über die Syntheseverhältnisse der G-Chromosomen bei den einzelnen Mongolismuspatienten.

A					B					C											
		Ph ¹						Ph ¹						Ph ¹							
		●	◐	◑	○			●	◐	◑	○			●	◐	◑	○				
●	○	○	4	3	6	5	●	●	○	3	2	-	4	●	◐	◑	5	3	3	12	
◐	○	○	2	3	1	9	◐	◐	○	8	2	2	3	●	◐	○	6	2	2	4	
◑	○	○	2	1	2	8	◑	◑	○	3	3	-	4	●	◑	○	1	2	2	10	
●	◐	◐	11	8	7	6	●	●	◐	5	5	1	4	●	◑	○	3	4	5	10	
●	◑	◑	6	6	1	4	●	●	◑	4	1	2	2	●	●	●	2	1	-	1	
◐	◑	◑	3	2	2	4	◐	◐	◑	1	2	-	3	◐	◐	◐	-	-	1	1	
															◑	◑	◑	2	-	-	3
															○	○	○	2	2	1	1
		28	23	19	36			24	15	5	20					21	14	14	42		
		106					64					91									

TABELLE IV

Übersicht über die Aufteilung des Gesamtmaterials von 261 Mitosefiguren auf sämtliche denkbaren Möglichkeiten des Synthesemusters der Chromosomen der Gruppe G bei der chronisch myeloischen Leukämie.

Patienten / Geschlecht		A	B	C	Gesamtzahl der
					ausgewerteten Mitosen;
W. V.	männl.	61	33	46	140
S. K.	männl.	12	6	7	25
B. D.	weibl.	13	6	18	37
R.	männl.	7	6	5	18
F. N.	männl.	4	4	5	13
N. S.	männl.	9	9	10	28
		106	64	91	261

TABELLE V

Übersicht über die Syntheseverhältnisse der G-Chromosomen bei den einzelnen Leukämiepatienten.

Patienten	Ph ¹ - Chromosom			
	●	◐	⊗	○
W. V.	33	31	27	48
S. K.	9	4	7	5
B. D.	13	2	3	19
R.	9	4	-	5
F. N.	6	6	-	1
N. S.	3	5	1	20
	73	52	38	98

TABELLE VI

Übersicht über die Häufigkeit der Markierungsgrade des Philadelphia-Chromosoms.

Mein besonderer Dank gebührt in erster Linie dem Direktor des Hämatologischen Institutes der GSF, Herrn Professor Dr. W. STICH, für die Überlassung des Themas, für die Erlaubnis in seinem Institut arbeiten zu können und nicht zuletzt für seine wohlwollende persönliche Unterstützung.

Herrn Professor Dr. H. SCHWIEGK, Direktor der I. Medizinischen Klinik, bin ich für die Übernahme des Korreferates dankbar.

Gleichzeitig möchte ich Herrn Dr. F. BACK sehr herzlich danken, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und der mich mit manch wertvollem Hinweis unterstützte.

- 1) YUNIS, J.: Human Chromosome Methodology,
Academic Press New York and London, 1965.
- 2) PENROSE: Chromosomal Translocations in Mongolism and in Normal Relatives,
Lancet 409-410, August 1960.
- 3) GERMAN, L.: The Pattern of DNA Synthesis in the Chromosomes of Human Blood Cells,
The Journal of Cell Biology, Vol. 20 Nr. 1, pp 37-55, 1964.
- 4) GILBERT, MULDAL, LAITHA, ROWLEY:
Time-Sequence of Human Chromosome Duplication,
Nature Vol. 195 Nr. 4844 pp 869-873, September 1962.
- 5) SCHMID, W.: DNA Replication Patterns of Human Chromosomes,
Cytogenetics 2: 175-193, 1963.
- 6) MOOREHEAD, DEFENDI:
Asynchrony of DNA Synthesis in Chromosomes of Human Diploid Cells,
Journal of Cell Biology 16 pp 202-209, 1963.
- 7) MORISHIMA, GRUMBACH, TAYLOR:
Asynchronous Duplication of Human Chromosomes and the Origin of Sex Chromatin,
Proc. nat. Acad. Sci., pp 756-763, Wash. 48: 1962.
- 8) MOOREHEAD, NOWELL, MELLMANN, BATTIPS, HUNGERFORD:
Chromosome Preparations of Leucocytes Cultured from Human Peripheral Blood,
Exper. Cell. Res. 20, pp 613-616, 1960.
- 9) NOWELL, HUNGERFORD:
A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia,
Science Nr. 132, 1497, 1960.
- 10) NOWELL, HUNGERFORD:
A Minute Chromosome,
Nat. Cancer Inst. 25, 85, 1960.

- 11) HAMPTON, J.: *Chromosomes in Medicine*.
Little Club Clinics in Developmental Medicine,
London, 1962.
- 12) GUSTAVSON, K.-H.:
Down's Syndrome, A Clinical and Cytogenetical Investigation, Publication from The Institute for Medical Genetics of the University of Uppsala, Sweden, 1964.
- 13) YUNIS, HOOK, MAYER:
Identification of the Mongolism Chromosome by DNA Replication Analysis,
American Journal of Human Genetics, Vol. 17 No. 2, 1965.
- 14) YUNIS, HOOK, MAYER:
DNA-Replication Analysis in Identifying the Cytogenetic Defect in Down's Syndrome,
Lancet 465-466, February 1965.
- 15) CAWEIN, LAPPAT, RACKLEY, LEXINGTON:
Down's Syndrome and Chronic Myelogenous Leukemia,
Arch. Intern. Med. Vol. 116, Oct. 1965.
- 16) TOUGH, I.M.: Cytogenetic Studies in Chronic Myeloid Leukemia and Acute Leukemia Associated With Mongolism,
Lancet i 411, 1961.
- 17) KRIVIT, GOOL: Simultaneous Occurrence of Mongolism and Leukemia. Report of a Nation-Wide Survey,
Am. Journ. Dis. Child 94/289, 1957.
- 18) STEWART, WEBB, HEWITT:
Mongolism and Leukemia,
Brit. Med. J. 1, 1495, 1958.
- 19) RUDKIN, HUNGERFORD, NOWELL:
DNA-Contents of Chromosome Ph¹ and Chromosome 21 in Human Chronic Granulocytic Leukemia,
Science 144 : 1229, 1964.
- 20) HAYNES, M.: Autoradiographic Studies of the Chromosomes in Chronic Granulocytic Leukemia,
Nature Vol. 207, pp 552-553, July 1965.

- 21) BIANCHI, LIMA DE FARIA, JAWORSKA:
A Technique for Removing Silver Grains and Gelatin from
Tritium Autoradiographs of Human Chromosomes,
Hereditas 14-51, 1965.
- 22) GIANELLI: Autoradiographic Identification of the D-Chromosome
Responsible for D₁ Trisomic Patau's Syndrome,
Nature Vol. 208, Nr. 5011, pp. 669-672, Nov. 1965.
- 23) KING, GILLIS, BAIKIE:
Alkaline Phosphatase Activity of Polymorphs in Mongolism,
Lancet ii, 1302, 1962.
- 24) TEPLITZ, ROSEN: Granulocytic Leukemia, Ph¹-Chromosome and Leukocyte
Alkaline Phosphatase;
Lancet ii 418-419, 1964.
- 25) TEPLITZ, R.: Regulation of Leukocyte Alkaline Phosphatase and the
Philadelphia Chromosome,
Nature Vol. 209, Nr. 5025, pp. 821, February 1966.
- 26) GAVOSTO, PEGORARO, PILERI, BERNARDELLI:
Behavior of DNA Synthesis in Different Phases of the
S-Period in Chromosomes of Human Acute Leukemia,
Euratom Eur 2451 e, 1965.
- 27) GILBERT, LAJTHA, MULDAL, OCKEY:
Synchrony of Chromosome Duplication,
Nature Vol. 209, pp. 537-538, Jan. 1966.
- 28) ENGEL: Transient Congenital Leukemia in 7 Infants with Mon-
golism,
J. Ped. 65 / 303-305, 1964.
- 29) TOUGH, JACOBS, COURT-BROWN, BAIKIE, WILLIAMS:
Cytogenetic Studies on Bone Marrow in Chronic Myeloid
Leukemia,
Lancet i 844-846, 1963.
- 30) BAIKIE, BROWN, JACOBS:
Lancet 1251, 1960.
- 31) PATAU, K.: Chromosome Identification and Denver Report,
Lancet i 933-934, 1961.

- 32) STICH, BACK, DÖRMER, TSIRIMBAS:
Doppel-Philadelphia-Chromosom und Isochromosom 17
in der terminalen Phase der chronischen myeloischen
Leukämie,
Klinische Wochenschrift 8, pp.334-336, 1966.
- 33) HUGHES, BOND, BRECHER, CRONKITE, PAINTER:
Cellular Proliferation in Mouse as Revealed by Autora-
diography with Tritiated Thymidine,
Proc. Nat. Acad. Sci. US 44 : 476, 1958.
- 34) BAIKIE:
A Possible Spezific Chromosome Abnormality in Human
Chronic Myeloid Leukemia,
Nature 188 / 1165-1166, 1960.
- 35) LIMA DE FARIA, REITALU, BERGMAN:
The Pattern of DNA Synthesis in the Chromosomes of
Man,
Hereditas 47, 695-704, 1961.
- 36) BADER, MILLER, MUKHERJEE:
Observations on Chromosome Duplication in Cultured
Human Leucocytes,
Exp. Cell. Res. 31, 100-112, 1963.
- 37) KIKUCHI, SANDBERG:
Chronology and Pattern of Human Chromosome Repli-
cation,
Nat. Cancer Inst. 32, 1109, 1964.
- 38) LONDON CONFERENCE ON:
"The Normal Human Karyotype" , August 28-30, 1963.
Ann. Hum. Genet. 27, 295, 1964.
- 39) PATAU, K.:
Chromosome Identification aus Yunis:
Human Chromosome Methodology,
London 1965.

LEBENS LAUF

Mein Geburtsort ist München. Dort wurde ich am 15. März 1942 als Sohn des Polizei-Oberinspektors Josef Baumann und seiner Ehefrau Maria, geb. Götz, geboren. Wie meine Eltern besitze ich die deutsche Staatsangehörigkeit und bekenne ich mich zum katholischen Glauben.

Nach vierjährigem Besuch der städt. Volksschule in München trat ich am 2. September 1952 in das Alte Realgymnasium, München, über. Dort erwarb ich nach weiteren neun Jahren am 19. Juli 1961 das Reifezeugnis. Im Oktober 1961 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Medizin an der Universität München, wo ich dann auch nach elf Semestern im Juli 1967 die ärztliche Prüfung erfolgreich ablegte.

